Bəzi CAM Bitkilərdə Karboanhidraza Fermentinin Fiziki-Kimyəvi Xassələri

T.Y. Orucova, Ş.M. Bayramov*, N.M. Quliyev
*AMEA Botanika İnstitutu, Badamdar şossesi, 40, Bakı AZ1073, Azərbaycan, *E-mail: biochemistry@mail.ru*

CAM bitkilərinin (*Kalanchoe daigremontiana, Sedum oppositifolium* və *Mesembryanthemum crystallinum)* yarpaqlarından ayrılan karboanhidraza (KA) fermentinin aktivliyini təyin etmək üçün optimal şərait seçilmiş və aktivliyin dəyişmə dinamikasına müxtəlif amillərin təsiri öyrənilmişdir. Bu bitkilərin yarpaqlarından ayrılmış KA-nın aktivliyi C_3- və C_4-bitkilərdən ayrılmış KA fermentinin aktivliyi ilə yaxın olmuşdur. Perkoll qradientindən istifadə etməklə KA-nın subhüceyrə lokalizasyası öyrənilmiş və CAM bitkilər üçün xarakterik olan turşuluğun sutka ərzində dəyişmə dinamikası tədqiq edilmişdir.

GİRİŞ

Ali bitkilərin təxminən 6%-i CO_2-nın assimilyasiyasını fotosintezin CAM yolu ilə həyata keçirirlər (Cushman, 2001). Metabolizmin bu yolu ilk dəfə *Crassulaceae* fəsiləsində aşkar olunduğundan metabolizm fəsilənin adına müvafiq olaraq adlandırılmışdır. CAM metabolizm üçün xarakterik olan bir neçə əsas cəhət mövcuddur. Bu bitkilərdə ağızcıqlar gecə açılır, atmosferdən tutulan karbon qazı, fosfoenolpiruvat-karboksilaza fermenti vasiəsilə fiksasiyasa olunaraq, üzvi turşular, xüsusən də malat şəkildə vakuolda toplanır (I faza). Gündüz vaxtı yüksək temperaturun təsirindən ağızcıqlar bağlanır, üzvi turşular vakuolu tərk edir, müxtəlif fermentlərin iştirakı ilə sitozolda dekarboksilləşir. Dekarboksilləşmə nəticəsində ayrılan CO_2 Kalvin tsikli fermentləri hesabına yenidən assimilyasiya olunaraq, metabolizmə qoşulur (III faza). Göründüyü kimi C_4- bitkilərdə olduğu kimi CAM bitkilərdə də CO_2 qatılaşdırıcı mexanizm mövcuddur (Lüttge, 2004).Lakin bu bitkiləri bir-birindən fərqləndirən xüsusiyyət-karboksilləşmə və dekarboksilləşmə reaksiyalarının məkan və zamana görə fərqlənməsidir. CAM metabolizmdə yuxarıda qeyd edilən iki əsas - I və III fazalar ilə yanaşı iki keçid - II və IV fazalar da mövcuddur. II faza erkən (sübh vaxtı), IV faza gecikmiş işıq perioduna (axşamçağı) təsadüf edir. Bu müddətdə ağızcıqlar çox qısa vaxt ərzində açılır və bu zaman asssimlyasiya olunan CO_2 qazı bitkinin böyümə və inkişafına sərf olunur. II və IV fazalar ətraf mühit amillərinin təsirinə qarşı daha həssasdır (Lüttge, 2004).

Ekoloji baxımdan fotosintezin CAM yolu su çatışmamazlığı şəraitinə adaptiv uygunlaşmadır. Belə ki, bu yolla fotosintez edən bitkilər əlverişsiz mühit şəraitində sudan daha effektiv istifadə edirlər (Griffiths, 1989). Yəni, gündüz vaxtı CAM bitkilərdə ağızcıqların bağlanması artıq su itkisinin qarşısını alır. Ətraf mühit şəraitindən asılı olaraq, CAM bitkilərini obliqat və fakültətiv olmaqla iki qrupa bölmək olar. Obliqat CAM bitkilər daima CAM fotosintez həyata keçirdikləri halda, fakültətiv CAM bitkilər əlverişli mühit şəraitində C_3 yolla, qeyri-əlverişli mühitdə isə CAM yolla fotosintez edirlər (Holtum, 2002). CAM metabolizmdə karbon qazının ilkin fiksasiyasında iştirak edən fosfoenolpiruvat-karboksilaza fermenti substrat kimi bikarbonatdan istifadə etdiyi üçün CO_2-nin bikarbonata çevrilməsi çox vacibdir. Bu funksiyanı isə hüceyrədə karboanhidraza (KA) fermenti yerinə yetirir. C_3- və C_4-bitkilərdə bu ferment ətraflı öyrənilsə də, CAM bitkilərdə onun haqda məlumat çox azdır. Bu baxımdan bu bitkilərdə karboandidraza fermentinin ətraflı və müqayisəli şəkildə öyrənilməsi elmi əhəmiyyət kəsb edir.

MATERİAL VƏ METODLAR

Tədqiqat obyekti olaraq, CAM bitkilərinin (*Kalanchoe daigremontiana, Sedum oppositifolium* və *Mesembryanthemum crystallinum)* yarpaqlarından istifadə olunmuşdur. *K.daigremontiana S.oppositifolium* obliqat, *M crystallinum* fakültətiv CAM bitkiləridir. Bitkilər təbii və süni iqlim şəraitində yetişdirilmişdir. Sutkalıq rejim 12 saat gündüz (26°C), 12 saat qaranlıq (18°C), foton axını 350 μmol m^{-2} s^{-1} olmuşdur. Beş həftəlik *M.crystallinum* bitkilər 7 gün müddətində tərkibində 0,4 M NaCl olan Hoagland məhlulu ilə suvarılmışdır. Bu miqdar bitkinin CAM formaya keçməsinə şərait yaradır. Yarpaqdakı turşuluğun miqdarı 1%-li fenolftalen məhlulundan indikator kimi istifadə edilməklə pH-ın neytral qiymətinə qədər 10 mM NaOH-la titirləməklə müəyyən edilmiş və bu qiymət yaş çəkiyə görə μmol H^+ g^- ilə ifadə olunmuşdur. Karboanhidraza fermentinin aktivliyi elektrometrik üsulla görə təyin edilmişdir (Wilbur and Anderson, 1948).

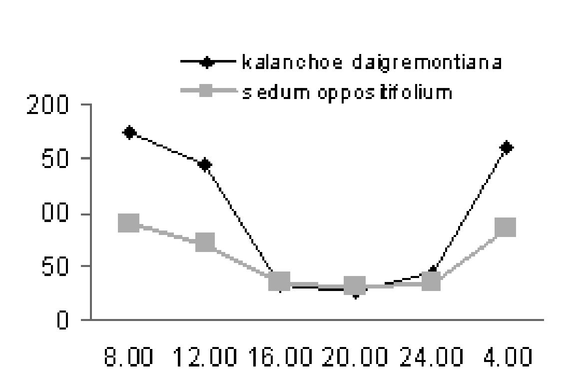
NƏTİCƏLƏR VƏ ONLARIN MÜZAKİRƏSİ

CAM bitkilər uçun xarakterik olan yarpaqlarda turşuluğun sutka ərzində dəyişməsi öyrənilmişdir.

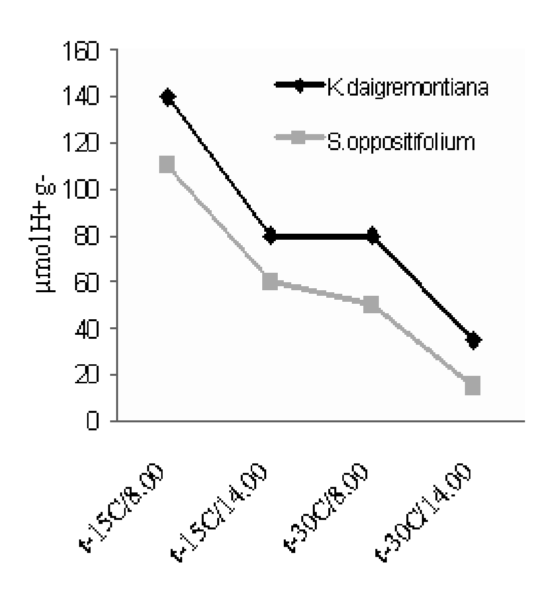
Sutkanın gecə vaxtlarinda turşuluğun miqdari artır, gündüz vaxtlarında isə turşuluq azalır. Həmçinin turşuluğun miqdarının dəyişməsi günün müxtəlif saatlarında və müxtəlif temperaturlarda öyrənilmişdir (Şək. 1 və 2).

Turşuluğun miqdarının vaxtdan və temperaturdan asılı olaraq dəyişməsi, bu bitkilərdə CAM metabolizmin baş verdiyini bir daha sübut edir.

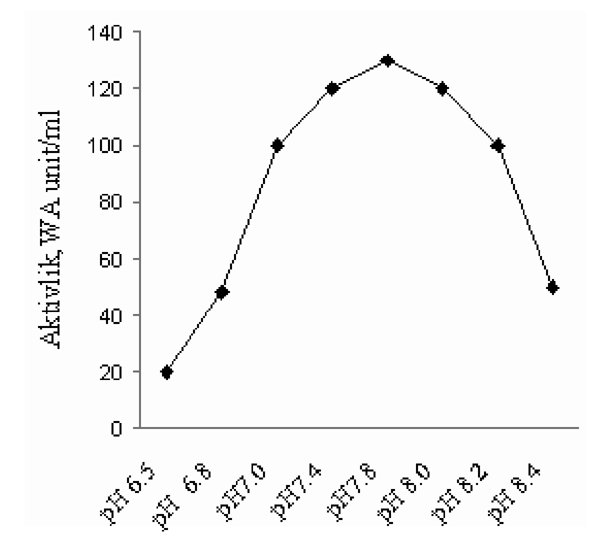
Aparılan təcrübələr nəticəsində müəyyən olunmuşdur ki, *M.crystallinum* və *S.oppositifolium-da* KA fermentinin aktivliyi pH-ın 7,2-7,8 qiymətlərində daha yüksəkdir (Şək. 3 və 4). Fermentin stabilliyi üçün SH-qruplarını reduksiya edən reagentlərdən - DTT və merkaptoetanoldan istifadə etdikdə fermentin aktivliyi daha uzun müddət stabil qalır. Bəzi nümunələrə DTT-nin sonradan əlavə edilməsi fermentin aktivliyinə heç bir təsir göstərmir. Öyrənilən CAM bitkilərdə KA fermentinin aktivliyi sutka ərzində kəskin dəyişməmişdir.



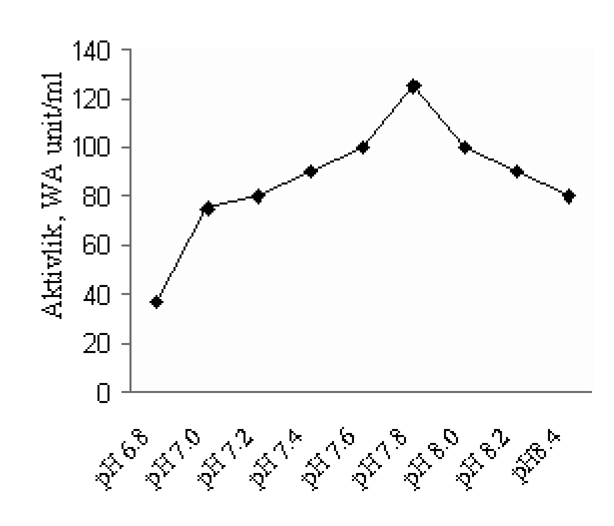
Şək. 1. *K.daigremontiana* və *S.oppositifolium* yarpaqlarında ümumi turşuluğun sutka ərzində dəyişməsi.



Şək. 2. *K.daigremontiana* və *S.oppositifolium* yarpaqlarında ümumi turşuluğun vaxtdan və ətraf mühitin temperaturundan asılı olaraq dəyişməsi.



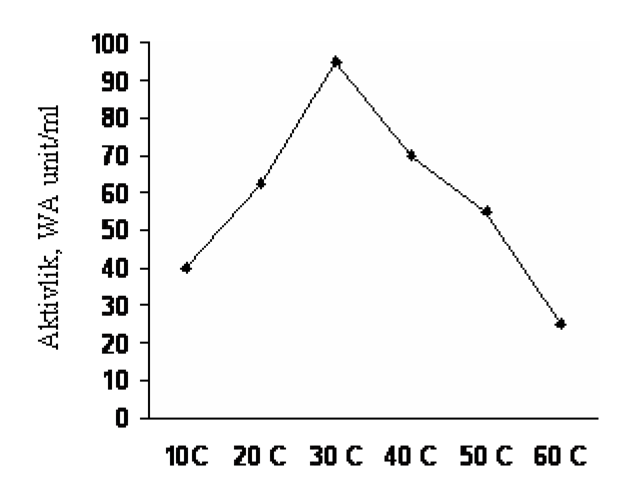
Şək. 3. *M.crystallinum yarpaqlarından* ayrılmış KA fermentinin aktivliyinin mühitin pH-dan asılılığı.



Şək. 4. *S.oppositifolium* yarpaqlarından ayrılmış KA fermentinin aktivliyinin mühitin pH-dan asılılığı.

Quraqlıq stresi və yüksək temperatur (28-30°C) şəraitində fakultətiv CAM bitkisi olan *Sedum oppositifolium* və obliqat CAM bitkisi *Kalanchoe daigremontiana* yarpaqlarında CO_2-nın ilkin assimlyasiyasında iştirak edən karboanhidraza fermentinin aktivliyinin artması müşahidə olunmuşdur. Bu da dovşankələmi bitkisində yüksək temperatur və quraqlığın təsirindən fotosintezin CAM yolunun induksiya olunduğunu göstərir. Fermentin subhüceyrə paylanmasının saxaroza qradientində sentrifuqalaşdırma üsulu ilə tədqiqi göstərmişdir ki, ferment həm sitazolda, həm də xloroplastlarda lokalizə olunmuşdur. Bu da onu deməyə imkan verir ki, KA fermenti CAM bitkilərində həm karboksilləşmə, həm də dekar boksilləşmə mərhələsində CO_2-nın fiksasiyasında iştirak edir.

Sedum oppositifolium yarpaqlarından ayrılmış KA fermentinə temperaturun təsirini öyrənmək üçün fermentin ekstraktı müxtəlif temperaturlarda 5 dəq müddətində inkubasiya edilmişdir. Alınmış nəticələr göstərmişdir ki, fermentin aktivliyi 30-35°C arasında daha yüksək olmuşdur (Şək. 5).



Şək. 5. *S.oppositifolium* yarpaqlarından ayrılmış, müxtəlif temperaturlarda inkubasiya olunmuş KA fermentinin aktivliyinin dəyişmə dinamikası.

C_3 və CAM formalı *M. crystallinum* yarpaqlarınıda KA fermentinin subhüceyrə lokalizasiyasının tədqiqi zamanı sitozol və xloroplast fraksiyaları arasında ciddi fərq olmamışdır. Hər iki tipdə fermentin total aktivliyinin 60% xloroplast, 40% isə sitozol fraksiyasında lokalizasiya olunduğu müəyyən edilmişdir (Cədvəl 1). Eləcə də *Mesembryanthemum crystallinum* yarpaqlarından ayrılmış KA fermentinin aktivliyinin müxtəlif qatılıqlı (50-500 mM) NaCl-un təsirindən dəyişmədiyi aşkar edilmişdir (Cədvəl 2). Bu da onu deməyə əsas verir ki, Na^+ və Cl^- ionları hətta yüksək qatılıqlarda fermentin aktivliyinə təsir etmir.

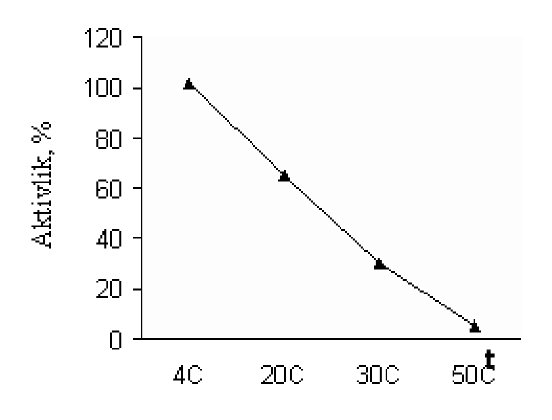
Cədvəl 1. *M.crystallinum* yarpaqlarından ayrılmış KA fermentinin subhüceyrə lokalizasiyası

M.crystallinum	fermentin lokalizasiyası %	
	Sitozol	Xloroplast
C_3 forma	37,8	62,2
CAM forma	40,0	60,0

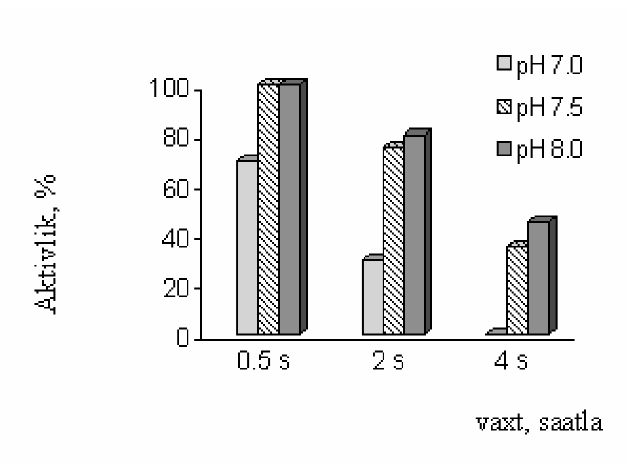
Cədvəl 2. Müxtəlif qatılıqlı NaCl məhlulunun *M.crystallinum* yarpaqlarından ayrılmış KA fermentinin aktivliyinə təsiri

Qatılıq NaCl(mM)	KA fermentinin aktivliyi, ml WA/unit
0	135
50	135
100	135
150	135
200	135
400	135

Zn atomları ilə kompleks əmələ gətirən 1,10-fenontrolinin *M.crystallinum*-dan ayrılmış KA fermentinin aktivliyinə təsiri, mühitin pH-dan və temperaturundan asılı olaraq öyrənilmişdir (Şək. 6 və 7). Temperatur 30°C-dan yuxarı olduqda, neytral və zəif qələvi mühitdə, 1,10-fenontrolin 2 saat müddətində fermenti tamamilə inaktivləşdirir. Lakin pH-ın qiyməti 7.6-8.3 arasında dəyişdikdə bu reagentin təsiri ilə fermentin aktivliyinin tam itməsi üçün uzun müddət tələb olunur.



Şək. 6. *M.crystallinum* yarpaqlarında 1,10-fenon-trolininlə (2 mM) inaktivləşən KA fermentinə temperaturun təsiri.



Şək. 7. *M.crystallinum* yarpaqlarından ayrılmış KA fermen-tinin aktivliyinə 1,10- fenontrolinin (2mM) vaxtdan asılı olaraq təsiri (30°C).

Alınan nəticələr göstərir ki, CAM bitkilərdə KA fermenti CO_2 qazının qatılaşdırılmasında və ilkin assimlyasiyasında iştirak edir. Müxtəlif CAM bitkilərdə, mühitin pH-dan və temperaturdan asılı olaraq, KA fermentinin aktivliyinin sutka ərzində dəyişməsi ilə bu fermentin subhüceyrə paylanması arasında oxşarlıq müşahidə edilmişdir.

Mühitin pH-dan və temperaturundan asılı olaraq, sink atomları ilə kompleks əmələ gətirən

1,10-ortofenontrolinin fermentin aktivliyini inaktivasiya etməsi, sink atomlarının fermentin katalitik aktivliyində iştirakını sübut edir.

ƏDƏBIYYAT

Cushman J.C. (2001) Crassulacean acid metabolism: A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. Plant Physiol. **127:** 1439-1448.

Griffiths H. (1989) Carbon dioxide concen-trating mechanisms and the evolution of CAM in vascular epiphytes. Ecolocical Studies, Berlin Heidelberg, New-York: Springer-Verlag **76:** 42-86.

Holtum J.A.M. (2002) Crassulacean acid metabolism: plasticity in expression, complexity of control. Function. Plant Biol. **29:** 657-661.

Lüttge U. (2002 b) CO_2-concentrating: consequences in crassulacean acid metabolism. J. Exp. Bot. **53:** 2131-2142.

Lüttge U. (2004) Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism. Ann. Bot. **93:** 629-652.

Wilbur K.M., Anderson N.G (1948) Electrometric and colorimetric determination of carbonic anhydrase. J. Biol. Chem. **176:** 147-154.

T.Y. Orucova, Ş.M. Bayramov, N.M. Quliyev

Physical and Chemical Properties of Carbonic Anhydrase in Some CAM Plants

Optimum conditions were selected to determine the activity of CA isolated from leaves of CAM plants and activity change dynamics was studied. CA activity of CAM plants appeared to be similar to that of from C_3 and C_4 plants. Subcellular localization of CA was investigated using percoll gradient. Diurnal changes of titratable acidity characteristic for CAM plants were also determined.

Т.Я. Оруджова, Ш.М. Байрамов, Н.М. Гулиев

Физико-Химические Свойства Карбоангидразы Некоторых CAM Растений

Были выбраны оптимальные условия для определения активности КА, выделенной из листьев CAM растений, и была изучена динамика изменения активности данного фермента. Активнсть КА CAM растений была схожей с таковой из C_3 и C_4-растений. Субклеточная локализация КА была исследована, используя перкольный градиент. Также были определены суточные изменения кислотности, характерные для CAM растений.